



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 44 925 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
G 01 N 1/42
A 01 N 1/00

AC

⑳ Aktenzeichen: 101 44 925.9
㉔ Anmeldetag: 12. 9. 2001
㉕ Offenlegungstag: 27. 3. 2003

DE 101 44 925 A 1

㉗ Anmelder:
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., 80636 München, DE

㉘ Vertreter:
v. Bezold & Sozien, 80799 München

㉚ Erfinder:
Fuhr, Günter, Prof. Dr., 13187 Berlin, DE; Hagedorn,
Rolf, Dr., 13057 Berlin, DE; Zimmermann, Heiko, Dr.,
66386 St. Ingbert, DE

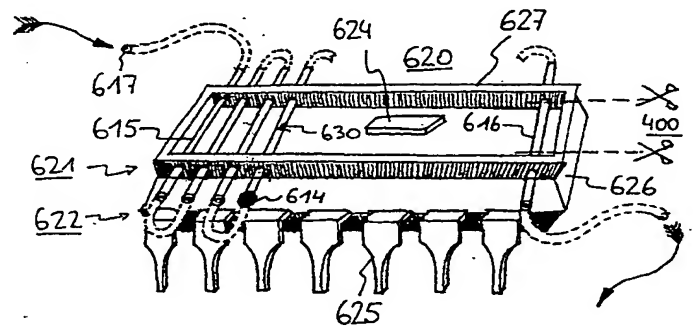
㉞ Entgegenhaltungen:
DE 198 41 554 A1
DE 198 38 232 A1
DE 197 36 470 A1
DE 197 16 913 A1
DE 100 60 889 A1
DE 299 06 382 U1
US 59 21 102 A
US 55 61 556 A
US 52 33 844 A
US 49 69 336
EP 03 47 579 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉟ Verfahren und Vorrichtung zur Kryospeicherung

㊱ Es werden ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Kryo-
konservierung beschrieben, bei denen auf einem Spei-
chersubstrat mindestens eine Probe angeordnet und po-
sitionsspezifisch Probandaten, die für Merkmale der Pro-
be charakteristisch sind, gespeichert.



DE 101 44 925 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zur Kryospeicherung von Proben, insbesondere zur Herstellung, Lagerung und Manipulierung biologischer Proben im kryokonservierten oder aufgetauten Zustand, wie z. B. ein Kryospeicherverfahren für biologische Zellen. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zum Schreiben und Lesen von Daten. Die Erfindung betrifft weiterhin eine Vorrichtung zur Kryospeicherung von Proben, insbesondere ein Speichersubstrat für biologische Proben, wie z. B. Zellen, eine Vorrichtung zum Schreiben und Lesen von Daten in Speichermedien und ein Kryobanksystem. Die Erfindung betrifft auch Anwendungen der Kryokonservierung biologischer Proben.

[0002] Die Kryokonservierung ist ein allgemein bekanntes Verfahren zur Haltbarmachung insbesondere biologisch oder medizinisch relevanter Materialien. Diese Materialien umfassen bspw. Gewebe und Organe, Körperflüssigkeiten oder auch einzelne Zellen oder Zellbestandteile. Die Kryokonservierung erfolgt nach bestimmten Prozeduren in Behältern oder auf Substraten, deren Gestalt an das Material oder Probe angepasst ist. Behälter zur Kryokonservierung sind bspw. für Gewebe und Organe (siehe DE-OS 19 92 231, EP-A 0 853 238, DE-OS 197 25 768, DE-OS 199 05 163), für Blutkomponenten (siehe z. B. DE-OS 198 26 350) und für zell- oder tropfenförmige Kryoproben (siehe z. B. US-A-5 275 016, EP-B 0 475 409, DE-OS 199 21 236, EP-B 0 804 073) bekannt.

[0003] Ein generelles Anliegen bei der Kryokonservierung biologischer Proben besteht in der Identifizierbarkeit der Proben. Kryokonservierte Proben müssen in Bezug auf ihre Herkunft und Eigenschaften mit hoher Sicherheit identifizierbar sein, ohne dass ein Auftauen erforderlich ist. Bei den makroskopischen Kryoproben ist dies kein Problem, da Organ- oder Blutbehälter mit einer Beschriftung versehen werden können. Das Auffinden der Kryoproben erfolgt in Abhängigkeit vom Ablagesystem der jeweiligen Kryobank.

[0004] Bei kleinen Kryoproben in Form von gefrorenen Suspensionstropfen, Zellen; Zellaggregaten oder Zellbestandteilen ist die Identifizierung der Kryoproben erheblich problematischer. Eine Kryoprobe wäre gegenüber der Beschriftung vernachlässigbar klein. Oft besteht ein Interesse an der Kryokonservierung einer Vielzahl mikroskopisch kleiner Proben. Die Lagerung und Identifizierung von kleinen Kryoproben mit Beschriftung wäre unpraktikabel. Des Weiteren liegen die kryokonservierten Zellproben bei herkömmlichen Konservierungstechniken, die auf dem Aufsprühen von Zellsuspensionen auf gekühlte Oberflächen (siehe z. B. EP 0 475 409), in einem ungeordneten Zustand vor. Es können lediglich größere Mengen von Einzelproben unspezifisch gemeinsam konserviert werden.

[0005] Bei den in EP 0 804 073 und DE-OS 199 21 236 beschriebenen Konservierungstechniken ist eine geordnete Ablage und spezifische Bearbeitung selbst kleinster Proben auf Kryosubstraten möglich. Die Probenablage erfolgt bspw. unter Verwendung einer Mikrotropfeneinrichtung, die auf der Grundlage bestimmter Zielkoordinaten angesteuert wird. Die Proben befinden sich auf definierten Substratpositionen, an denen auch eine spezifische Vermessung von Probeneigenschaften und Identifizierung der Proben ermöglicht wird. Das Substrat kann mit einer Markierung versehen sein, um die Probenpositionen auf dem Substrat zu definieren. Beispielsweise wird in DE-OS 199 21 236 für die matrixartige Ablage von Kryoproben in geraden Zeilen und Spalten vorgeschlagen, das Substrat mit einer Bezeichnung der Spalten und Zeilen zu versehen. Diese Markierungstechnik ist in Fig. 12 (Stand der Technik) illustriert.

[0006] Die herkömmliche Markierung von Kryosubstraten gemäß Fig. 12 besitzt die folgenden Nachteile. Es wird zwar die Identifizierung von Proben ermöglicht; damit wird aber lediglich eine Positionsinformation gegeben. Der beschränkte Informationsgehalt der Substratmarkierung stellt jedoch ein Problem dar, da neben der Probenidentifizierung auch zusätzliche Daten, z. B. über die Beschaffenheit oder die Vorgeschichte der Probe oder über Messergebnisse verfügbar sein sollen. Diese Daten könnten zwar in einer parallel betriebenen Datenbank gespeichert werden. Der getrennte Betrieb von Kryo- und Datenbanken stellt aber ein erhebliches Risiko für die Sicherheit der Merkmalszuordnung zu den einzelnen Proben dar. Dieses Risiko ist insbesondere bei humanmedizinischen Anwendungen kritisch, da eine Probenverwechslung den Erfolg einer weiteren Verwendung der Kryoprobe vereiteln kann. Außerdem besitzt die Substratmarkierung den Nachteil, dass eine Probenidentifizierung nur im Verbund mit dem Kryosubstrat möglich ist. Wenn eine Probenentnahme erfolgt, wie es bspw. in DE-OS 199 21 236 beschrieben wird, kann nach Trennung vom Kryosubstrat eine Probenidentifizierung nur durch eine aufwendige Messung von Probeneigenschaften im aufgetauten Zustand erfolgen.

[0007] Aus DE-OS 197 52 085 ist ein Probenträger für mikroskopische Untersuchungen an einer Vielzahl von Proben bekannt. Der herkömmliche Probenträger wird durch ein in Fig. 13 (Stand der Technik) in schematischer Draufsicht gezeigtes Substrat mit einer Vielzahl von Probeaufnahmeräumen gebildet. Das Substrat besitzt bspw. die Form eines Plattenspeichers (z. B. CD). Zwischen einem in der Substratmitte befindlichen Durchgangsloch und den matrixartig angeordneten Probeaufnahmeräumen ist ein Ringbereich gebildet. Aus DE-OS 197 52 085 ist bekannt, diesen Ringbereich zu Speicherung von Probedaten auszugestalten. Der herkömmliche Probenträger besitzt den Nachteil, lediglich zur Aufnahme von flüssigen Proben und nicht für die Kryokonservierung ausgelegt zu sein. Außerdem stellt die Speicherung von Probedaten auf dem Innenring des selben Nachteile dar, wie die o. g. Substratmarkierung. Es können zwar mehr Daten gespeichert werden; die Zuordnung zu den einzelnen Proben ist jedoch nicht fehlerfrei möglich.

[0008] Neben den genannten Nachteilen der herkömmlichen Techniken gibt es des Weiteren den folgenden Grund für die bisher gering entwickelte Anwendung der Kryokonservierung insbesondere in der zellulären Biotechnologie. Wenn ein direktes Einfrieren biologischer Proben in einer flüssigen Kühlphase (z. B. Stickstoff) erfolgt, besteht ein Kontaminationsrisiko. Über die Kühlphase können Viren auf die Proben übertragen werden. Um dieses Risiko zu vermeiden, muss der Kontakt mit der flüssigen Phase vermieden oder für eine dichte Abdeckung der Proben gesorgt werden. Dies ist bisher jedoch nicht in praktikabler Weise realisiert worden.

[0009] Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Kryokonservierung bereitzustellen, mit dem die Nachteile der herkömmlichen Techniken überwunden werden, das einen erweiterten Anwendungsbereich besitzt und insbesondere für automatisierte Konservierungsanlagen geeignet ist. Das neue Verfahren zur Kryokonservierung soll insbesondere ermöglichen, dass Probedaten in größerem Umfang und mit erhöhter Datensicherheit (d. h. mit erhöhter Sicherheit der Zuordnung von Probedaten zu bestimmten Proben) den Proben zugeordnet werden. Die Erfindung soll auch eine hochspezifische Datenzuordnung zu einzelnen Kryoproben ermöglichen. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, Vorrichtungen zur Umsetzung derart verbesserter Kryokonservierungsverfahren anzugeben.

[0010] Diese Aufgaben werden mit Verfahren oder Vor-

richtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1, 12, 19 und 21 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

[0011] Die Grundidee der Erfindung ist es, mindestens eine Probe auf einem Substrat anzuordnen und auf dem Substrat eine Speicherung von Probanddaten vorzunehmen, die für Merkmale der Kryoprobe charakteristisch sind. Die Speicherung der Probanddaten erfolgt positionsspezifisch in einem Probandatenspeicher vorzugsweise an der Ablageposition der jeweiligen Probe. Durch die Ablage von Proben und Probanddaten an gemeinsamen oder eng benachbarten oder aneinandergrenzenden Positionen des Substrates werden eine Reihe von Vorteilen erzielt. Die Probanddaten sind durch ihre Ablageposition eindeutig den jeweiligen Proben zugeordnet. Eine Verwechslung der Probenzuordnung wird ausgeschlossen. Bei Entnahme von Proben können simultan am Ablageort die zugehörigen Daten abgelesen oder mit dem Speichermedium vom Substrat entfernt werden, so dass auch nach der Probenentnahme bei der weiteren Verarbeitung die Identifizierung der Probe und die Zuordnung der Probanddaten sichergestellt ist. Es kann eine Entnahme von einzelnen Proben oder Teilproben bei je nach Anwendung wählbaren Temperaturen, insbesondere auch im gefrorenen Zustand, erfolgen.

[0012] Anwendungsabhängig können die Probenablage und die Datenspeicherung bei Raumtemperatur mit anschließender Abkühlung zur jeweils erforderlichen Konservierungstemperatur oder auch im gekühlten Zustand erfolgen. Die Erfinder haben überraschenderweise festgestellt, dass sowohl ein Schreiben als auch ein Lesen von Daten in oder aus an sich bekannten Speichermedien (z. B. optische Speicher, magnetische Speicher, elektromagnetische Speicher, FLASH-Speicher) selbst bei Konservierungstemperaturen unterhalb des Gefrierpunktes des Wassers möglich sind. Die Probandatensätze sind in allen Phasen eines Kryokonservierungsvorganges zuverlässig lesbar.

[0013] Besondere Vorteile besitzt die Erfindung bei der Ablage einer Vielzahl von Proben auf einem gemeinsamen Substrat mit einer positionsspezifischen Speicherung einer Vielzahl von Probandatensätzen. Das Substrat dient gleichzeitig als Kryosubstrat mit Probenträgern zur Aufnahme, Halterung und Freigabe von Kryoproben und als Datenträger, der wie ein für die Computertechnik bekanntes Speichermedium eine Vielzahl von Daten an den Substratpositionen entsprechend den jeweiligen Proben speichert. Die Proben werden z. B. portionsweise und zueinander isoliert als Zellsuspensionsvolumina in die Probenträger des Kryosubstrates eingebracht. Jedem Probenträger ist ein Probandatenspeicher zugeordnet, in dem zugehörige Daten abgelegt werden. Die gleichzeitige Ablage von Proben und Probanddaten erfolgt langzeitstabil und verwechslungssicher. Die erfindungsgemäße Kryokonservierung wird wegen der Analogie zur elektronischen Datenspeicherung hier als Kryospeicherung bezeichnet.

[0014] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Kryospeicherung auf einem Speichersubstrat, bei dem jeweils ein Probenträger und ein Probandatenspeicher ein integrales Bauteil bilden, dass reversibel oder irreversibel vom Substrat lösbar ist. Gegenstand der Erfindung ist auch ein Kryospeicherelement, das einen Probenträger zur Aufnahme einer Kryoprobe und einen Probandatenspeicher zur Ablage zugehöriger Probanddaten umfasst. Ein erfindungsgemäßes Speichersubstrat wird durch einen Grundkörper, der vorzugsweise eine flächige Gestalt besitzt, mit einer Vielzahl von Kryospeicherelementen gebildet. Das Speichersubstrat kann anwendungsabhängig eine beliebige 2- oder 3-dimensionale, geometrische Form besitzen. Der

Grundkörper des Speichersubstrates hat die Gestalt mindestens einer Leiterplatte, auf der die Kryospeicherelemente wie elektrische Schaltkreise (Chips) aufgesetzt sind.

[0015] Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zum Betreiben einer Kryobank mit einer Vielzahl von Speichersubstraten. Auf mindestens einem Speichersubstrat werden eine Vielzahl von Proben abgelegt, die bspw. zu einem Organismus (Probanden) gehören. Die Proben umfassen bspw. spezifische Zellen, des Probanden (z. B. Stammzellen, Gewebezellen). Die Ablage der Proben erfolgt zunächst gemeinsam mit den probenspezifischen Daten, insbesondere Daten zur Identifizierung der Art der Proben und des Probanden, des Konservierungszeitpunktes und der zum Zeitpunkt der Konservierung vorliegenden Messdaten. Im Verlauf des Betriebes der Kryobank werden Proben gemeinsam mit den zugehörigen Probanddaten für Messzwecke, diagnostische Aufgaben oder therapeutische Verfahren entnommen und/oder weitere Proben oder Probanddaten ergänzt. Die Probanddaten umfassen allgemein alle Merkmale und Parameter der Proben und des Probenspenders und ggf. Zusatzinformationen zur Datenablage auf dem Speichersubstrat.

[0016] Durch die folgenden, vorteilhaften Merkmale der erfindungsgemäßen Kryospeicherung werden die Nachteile herkömmlicher, planarer oder dreidimensionaler Substrate überwunden. Die Proben (z. B. eingefrorenen Zellsuspensionsvolumina) sind zu jedem Zeitpunkt spezifisch zugänglich. Dies gilt auch für den Tieftemperaturzustand. Es können an definierten Substratpositionen kleinste Probenvolumina angeordnet werden, die charakteristische Dimensionen im mm-Bereich oder darunter, vorzugsweise jedoch typische Größen von $10^3 \mu\text{m}^3$ ($10 \cdot 10 \cdot 10 \mu\text{m}^3$) bis zu einigen 10 nm^3 besitzen. Die Proben können bspw. eine oder eine Vielzahl von Zellen (10^5 bis 10^6 Zellen), Zellbestandteile, biologisch relevante Objekte (wie z. B. Membranvesikeln, DNA-Materialien, Makromoleküle) und/oder Zellverbände enthalten.

[0017] Die Proben können selektiv im tiefgeköhlten Zustand des Speichersubstrates entnommen werden, ohne dass die Kühlung der übrigen Proben unterbrochen wird. Zur Probenabnahme und zum Datenauslesen ist kein Auftauen des gesamten Speichersubstrates erforderlich.

[0018] Die Probanddaten können automatisch computergestützt geschrieben oder gelesen werden. Die Zuordnung von Probandatenspeichern und Probenträgern ist eindeutig. Die Proben werden verwechslungssicher abgelegt. Die Zuordnung entnommener Proben zu den Probanddaten und auch zum Speichersubstrat bleibt erhalten, so dass die Historie einer Probe rekapituliert werden kann. Dies stellt einen besonderen Vorteil bei medizinischen Anwendungen der Erfindung dar.

[0019] Erfindungsgemäße Speichersubstrate besitzen eine hohe, mechanische Stabilität und Langzeithaltbarkeit. Die erfindungsgemäße Kryospeicherung ermöglicht erstmalig eine sichere Ablage von biologischen Proben über Jahrzehnte. Eine Kryobank kann über die gesamte Lebensdauer eines Probanden, z. B. für die Dauer eines Menschenalters, zuverlässig betrieben werden. Das Speichersubstrat besitzt einen relativ einfachen Aufbau, der einen massenhaften Einsatz von Speichersubstraten in Kryobanken ermöglicht.

[0020] Die Erfindung besitzt auch Vorteile in Bezug auf das genannte Kontaminationsrisiko. Die erfindungsgemäßen Speichersubstrate ermöglichen eine Reihe von unten erläuterten Maßnahmen, mit denen verhindert wird, dass ein flüssiges Kühlmedium direkt mit den Proben in Verbindung kommt. Eine virale Kontamination über die Kühlphase wird vermieden. Es wird auch der Niederschlag von Wasser oder anderen Substanzen auf den Proben ausgeschlossen.

[0021] Ein weiterer, wichtiger Vorteil erfindungsgemäßer Speichersubstrate besteht darin, dass die abgelegten Proben im kryokorisiertem oder aufgetauten Zustand den üblichen Mess- und Analysemethoden (z. B. optische Messungen, mikroskopische Beobachtungen) bei gleichzeitiger Lesbarkeit der Datensätze zugänglich sind. Die Daten in den Probandatenspeichern werden auch bei mehrmaligen Einfrier- oder Auftauvorgängen aufrechterhalten.

[0022] Die Kryospeicherung erfolgt bei anwendungsabhängig gewählten Konservierungsbedingungen. Die Temperatur der Kryospeicherung und der zeitliche Ablauf von Temperaturabsenkung oder -steigerungen werden in Abhängigkeit von der Konservierungsaufgabe und dem Material gewählt. Die Konservierungstemperatur liegt im Bereich unterhalb der Raumtemperatur, vorzugsweise unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser bei Normaldruck und bei den bevorzugten Langzeitanwendungen unterhalb von -80°C . Die Kryotemperatur wird vorzugsweise durch ein flüssiges Kühlmedium (Stickstoff) oder den Dampf des Kühlmediums eingestellt.

[0023] Die Erfindung besitzt den Vorteil, dass kleinste Probenvolumina kryokonserviert werden. Dies ermöglicht schnelle Temperaturänderungen, reproduzierbare Konservierungsbedingungen und eine individuelle Probenhandhabung, -behandlung oder -messung.

[0024] Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im Folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

[0025] Fig. 1 schematische Perspektivansichten von erfindungsgemäßen Speichersubstraten mit Kryospeicherelementen,

[0026] Fig. 2 bis 5 schematische Perspektivansichten erfindungsgemäßer Kryospeicherelemente gemäß verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung,

[0027] Fig. 6 und 7 schematische Illustrationen der Beschickung von Probenträgern und der Entnahme von Proben,

[0028] Fig. 8 bis 11 schematische Perspektivansichten erfindungsgemäßer Speichersubstrate gemäß weiteren Ausführungsformen der Erfindung, und

[0029] Fig. 12 und 13 Draufsichten herkömmlicher Probenträger (Stand der Technik).

[0030] Erfindungsgemäß wird mindestens eine Probe in einem Probenträger auf einem Substrat angeordnet und auf dem Substrat eine Speicherung von Probandaten vorgenommen, die für Merkmale der Kryoprobe charakteristisch sind. Die Speicherung der Probandaten erfolgt positionsspezifisch in einem Probandatenspeicher vorzugsweise an der Ablageposition der jeweiligen Probe. Der Verbund aus einem Probenträger zur Aufnahme einer Kryoprobe und einem Probandatenspeicher zur Ablage zugehöriger Probandaten wird als Kryospeicherelement bezeichnet. Ein erfindungsgemäßes Speichersubstrat wird durch einen Grundkörper, der vorzugsweise eine flächige Gestalt besitzt, mit einer Vielzahl von Kryospeicherelementen gebildet. Bei den hier beschriebenen Ausführungsformen der Erfindung ist der Grundkörper des Speichersubstrates mindestens eine Leiterplatte, auf der die Kryospeicherelemente wie elektrische Schaltkreise (Chips) aufgesetzt sind.

[0031] Gemäß Fig. 1 wird der Grundkörper des Speichersubstrats 600 durch mindestens eine Leiterplatte 610 gebildet, auf der mindestens ein Kryospeicherelement 620 aufgesetzt ist. Die Leiterplatte 610 trägt elektrische (Leiterbahnen) oder optische (Lichtleiterfasern) Verbindungen 611, die jeweils eine Aufnahmefassung 612 zur Aufnahme von einem Kryospeicherelement mit einer externen (nicht dargestellten) Steuereinrichtung verbinden. Die Aufnahmefassung 612 entspricht im Wesentlichen dem Sockel einer her-

kömmlichen Schaltkreisfassung, in dem die Kontakte des Kryospeicherelements (siehe insbesondere Fig. 2 bis 4) eingesetzt werden. Alternativ kann die Aufnahmefassung auch in die Leiterplatte 610 integriert sein. An den Aufnahmefassungen 612 können zusätzlich jeweils Schaltkreise zur Signalanpassung, Signalumsetzung oder Detektion der auf den Verbindungsleitungen 611 Signale oder von auf optischem Wege strahlend gelieferten Datensignalen vorgesehen sein.

[0032] Die Verbindungsleitungen 611 können auf der Oberseite der Leiterplatte 610 mit den Aufnahmefassungen 612 (oberes Teilbild von Fig. 1) oder auf der entgegengesetzten Seite (unteres Teilbild von Fig. 1) vorgesehen sein. Im letzteren Fall können die Aufnahmefassungen 612 dichter angeordnet werden. Das untere Teilbild von Fig. 14 zeigt ferner, dass auf der Leiterplatte 610 auch ein Rechnerschaltkreis 613 zur Ansteuerung der Kryospeicherelemente, ggf. mit einem gesonderten RAM-Speicher, vorgesehen sein kann.

[0033] Jede Aufnahmefassung 612 ist zur Aufnahme eines Kryospeicherelementes 620 jeweils mit einem Probenträger 621 und einem Probandatenspeicher 622 eingerichtet. Gemäß einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung wird das Kryospeicherelement auf der Basis eines an sich bekannten, integrierten Schaltkreises (z. B. Speicherbaustein) gebildet. Der Schaltkreis enthält als Probandatenspeicher 622 z. B. mindestens einen RAM-Speicher. Das Kryospeicherelement 620 kann auch einen kompletten Rechnerschaltkreis enthalten, mit dem die Funktion des Kryospeicherelements verwaltet wird und über den das Kryospeicherelement nach außen kommuniziert. Der Probenträger 621 ist in oder in Verbindung mit der Kunststoffabdeckung oder Verkapselung des integrierten Schaltkreises gebildet. Einzelheiten verschiedener Ausführungsformen erfindungsgemäßer Kryospeicherelemente 620 sind in den Fig. 2 bis 11 gezeigt.

[0034] Das Kryospeicherelement 620 gemäß Fig. 2 umfasst einen Probenträger 621 und einen Probandatenspeicher 622. Der Probandatenspeicher 622 ist wie ein an sich bekannter, elektronischer Speicherchip mit Kontaktelektroden 625 und einer Verkapselung 626 aufgebaut, in der ein Speicherschaltkreis und ggf. ein Rechnerschaltkreis angeordnet sind. Die Verkapselung 626 besteht typischerweise aus einem Kunststoffmaterial.

[0035] Der Probenträger 621 ist auf der Oberseite der Verkapselung 626 befestigt oder als Teil der Verkapselung 626 gebildet. Der Probenträger 621 besteht aus einem Kunststoffrahmen 627, in den zur Probenaufnahme mindestens ein Kryobehälter 615 integriert ist. Der Kunststoffrahmen 627 ist beispielsweise ein Spritzgussteil mit einer Größe entsprechend der Oberfläche der Verkapselung 626. Die seitlichen Rahmenteile sind mit Bohrungen versehen, in denen die Kryobehälter 615 angeordnet sind.

[0036] Jeder Kryobehälter 615 bildet mindestens eine langgestreckte Probenkammer. Die mindestens eine Probenkammer besitzt eine langgestreckte Form derart, dass der Innenquerschnitt wesentlich kleiner als ihre Längsausdehnung ist. Als Probenkammern sind beispielsweise Schläuche, Hohladeln, Kapillaren oder dgl. vorgesehen. Der Innendurchmesser einer Probenkammer liegt beispielsweise im Bereich von $5\text{ }\mu\text{m}$ bis 4 mm . Die Länge kann beispielsweise im Bereich von $0,5\text{ cm}$ bis 10 cm gewählt sein. Der Quotient aus Querschnittsdurchmesser und Länge einer Probenkammer ist vorzugsweise kleiner als $1/10$. Die Bereitstellung von mindestens einem Kryobehälter 615 in Rohr- oder Schlauchform besitzt die Vorteile einer schnellen Beschickung oder Leerung der Probenkammern, einer hohen Miniaturisierbarkeit und einer hohen Einfriergeschwindigkeit.

[0037] Bei der in Fig. 2 illustrierten Ausführungsform der Erfindung ist zunächst ein Kryobehälter 615 durch einen mäanderförmig in den Rahmen 627 eingelegten Schlauch (teilweise dargestellt) gebildet. Nach Beschickung des Kryobehälters 615 über die Schlauchenden (siehe Pfeile) können die gestrichelt eingezeichneten Teile des Schlauches abgeschnitten werden, so dass die durchgezogen gezeichneten Abschnitte als getrennte Kryobehälter (z. B. 616) zurückbleiben. Alle Kryobehälter 615 sind einheitlich mit einer gemeinsamen Probe 630 beschickt, die vorteilhafterweise in Teilproben unterteilt ist. Mit einer mechanischen Trenneinrichtung 400 können die Teilproben (z. B. 616) vom Kryoelement 620 im gefrorenen oder im aufgetauten Zustand abgetrennt werden, ohne dass die übrigen Teilproben beeinflusst werden.

[0038] Auf der Oberfläche der Verkapselung 626 und/oder am Rahmen 627 der Probenaufnahme 623 können zusätzliche Steuereinrichtungen zur Manipulierung der Probe und/oder Sensor- und/oder Anzeigeeinrichtungen 624 vorgesehen sein. Die Steuereinrichtungen umfassen ggf. Kühl- und Heizelemente, z. B. Peltier-Elemente, Widerstandsheizelemente, zur gesteuerten Abkühlung oder Erwärmung der Probe oder Materialien mit erhöhter Wärmekapazität zur Reduzierung der Wärmebelastung der Probe während eines Chiptransportes. Die Sensor- und/oder Anzeigeeinrichtungen können eine Lichtquelle aufweisen, die bspw. einen bestimmten Zustand des Kryospeicherelements 620 bzw. der Probe signalisiert oder als Messlichtquelle für Messungen an der Probe 630 dient.

[0039] Zusätzlich kann jedes Ende eines Kryobehälters 615 mit einer Abdeckung 614 versehen sein, die die Probe vor Kontamination, Verdunstung und Sublimation schützt. Die Abdeckung 614 ist bspw. eine Plastikkappe, eine aufgeschweißte Folie oder ein anderes Bauteil, das eine dichte Verbindung mit den Enden des jeweiligen Kryobehälters 615 eingeht. Ist als Kryobehälter ein Schlauch vorgesehen, so kann die Abdeckung auch durch einen Teil des Schlauches selbst gebildet sein, indem dieser an seinen Enden zuklemmt wird.

[0040] Anstelle eines durchgehenden und ggf. zugeschnittenen Schlauches gemäß Fig. 2 können als Probenaufnahme 623 auch eine Vielzahl rohrförmiger Kryobehälter 615 aus einem starren Material vorgesehen sein, die quer (Fig. 2) oder parallel (Fig. 3) zur Längsausrichtung des Kryoelements 620 ausgerichtet sind. Bei der Ausführungsform gemäß Fig. 3 sind beispielsweise 5 Kryobehälter 615 in die Verkapselung 626 integriert. Dies kann durch Eingießen der Kryobehälter 615 in das Verkapselungsmaterial oder ein Aufkleben erfolgen. Die Kryobehälter 615 werden durch Hohladeln oder Kapillaren gebildet.

[0041] Die Beschickung eines Kryobehälters 615 erfolgt, indem an ein Ende ein Unterdruck angelegt und über das entgegengesetzte Einlassende 617 die Kryoprobe aufgenommen wird. Anstelle der Ausübung des Unterdrucks kann auch eine Probenaufnahme unter Wirkung von Kapillarkräften im Innern des Kryobehälters 615 vorgesehen sein. Insbesondere bei der Gestaltung gemäß Fig. 3 können in die einzelnen Kryobehälter 615 gleiche oder verschiedene Kryoprobe 631, 632, ... aufgenommen werden. Die Kryobehälter 615 sind vorzugsweise derart voneinander beabstandet, dass die Einlassenden 617 entsprechend dem Format einer Mikro- oder Nanotiterplatte ausgerichtet sind.

[0042] Gemäß einer alternativen, in Fig. 4 illustrierten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kryoelements 620 wird der Kryobehälter 615 des Probenträgers 622 durch einen Schlauch gebildet, dessen Durchmesser in Längsrichtung des Schlauches veränderlich ist. Es wechseln sich Abschnitte 618 mit einem geringen Durchmesser und Teilkam-

mern 619 ab, in denen der Schlauch erheblich verbreitert ist. Der Kryobehälter 615 umfasst eine Vielzahl von Teilkammern 619, die vorteilhafterweise mit einer mechanischen Trenneinrichtung 400 vom Kryoelement 620 abgetrennt werden können. Der Kryobehälter ist auf der Verkapselung 626 des Probandenspeichers 622 befestigt (z. B. aufgeklebt oder teilweise eingegossen). Die Beschickung des Kryobehälters 615 erfolgt unter Ausübung eines Unterdruckes derart, dass über das Einlassende 617 die suspendierte Kryoprobe in den Kryobehälter 615 eingesogen wird.

[0043] Gemäß Fig. 5 kann der Kryobehälter 615 auch aus einem Schlauch gebildet sein, der nur eine Teilkammer 619 aufweist, die wie dargestellt über einen Schlauchabschnitt 618 oder alternativ über mehrere Schlauchabschnitte beschickt oder entleert wird. Die Teilkammer 619 gemäß Fig. 5 ist beispielsweise aus einem Folienmaterial gebildet, das auf die Verkapselung 626 aufgeklebt ist.

[0044] Im Gegensatz zu den aus der zellulären Biotechnologie bekannten Diagnosechips besteht beim Kryospeicherelement 620 zwischen der Probe 630 einerseits und dem Probandenspeicher 622 und/oder den Steuer-, Sensor und/oder Anzeigeeinrichtungen 624 andererseits keine Verbindung, die auf eine Erfassung elektrischer Parameter der in der Probe eingefrorenen Zellen gerichtet ist.

[0045] In den Fig. 6 und 7 sind weitere Einzelheiten der Beschickung von und der Probenentnahme aus Kryoelementen 620 illustriert. Die Beschickung erfolgt gemäß Fig. 6 beispielsweise mit einer Ladeeinrichtung, die einerseits eine Vielzahl von Probenreservoirn 710 und andererseits eine Druckeinrichtung 720 aufweist. Das Kryospeicherelement 620 umfasst analog zu der in Fig. 2 gezeigten Ausführungsform einen rahmenförmigen Probenträger 621, an dem eine Vielzahl von Kryobehältern 615 in Form von Kapillaren oder Schläuchen angeordnet sind, deren Einlassenden 617 in die Probenreservoirn 710 ragen. Die Probenreservoirn 710 sind beispielsweise Vorratsbehälter, in denen sich Proben nach der Gewinnung von einem Probanden befinden. Die Druckeinrichtung 720 umfasst einen Druckaufsatz 721, der druckdicht auf die entgegengesetzten Enden der Kryobehälter 615 aufsetzbar ist, und eine Anschlussleitung 722, über die alle Kryobehälter 615 mit einem Unterdruck beaufschlagbar sind. Die Enden der Kryobehälter 615 sind vorzugsweise zur gemeinsamen Aufnahme des Druckaufsatzes 721 eingerichtet an einem Rahmenteil angebracht. Sie können beispielsweise in der Oberfläche des Rahmens 627 münden. Unter der Wirkung des Unterdruckes werden Proben 630 in die Kryobehälter 615 gesogen.

[0046] Nach der Beschickung des Probenträgers 621 wird das Kryospeicherelement 620 von der Ladeeinrichtung getrennt. Die Einlassenden 617 werden ggf. bis zum Rahmen 627 gekürzt. Das Kryospeicherelement 620 wird auf ein Speichersubstrat 610 (siehe Fig. 1) aufgesetzt und mit diesem in eine Umgebung mit reduzierter Temperatur, z. B. ein Kryogefäß in einer Kryobank überführt.

[0047] In Fig. 7 ist eine Möglichkeit der Probenentnahme von einem Kryospeicherelement 620 mit einem mäanderförmig geführten Kryobehälter 615 illustriert. Die Teilproben 616 werden mit einer mechanischen Trenneinrichtung 400, z. B. einer Schneideinrichtung, abgetrennt. Dies kann vorteilhafterweise im Zustand reduzierter Temperatur erfolgen, so dass die übrige Probe unverändert bleibt.

[0048] In den Fig. 8 bis 11 sind Ausführungsformen erfindungsgemäß verwendeter Kryospeicherelemente 620 gezeigt, bei denen im Unterschied zu den oben beschriebenen Ausführungsformen der Probenträger 621 nicht in eine Verkapselung des Speicherschaltkreises, sondern in dessen Substratmaterial integriert ist.

[0049] Fig. 8 zeigt beispielsweise einen Teil eines Kryo-

speicherelemente 620 (ohne Verkapselung und ohne Kontaktfüße). Es ist ausschnittsweise ein Speicherschaltkreis 800 mit einem Substrat 810 und integrierten Bauelementen 820 dargestellt. Das Substrat ist beispielsweise ein Halbleiterwafer, wie er üblicherweise zur Herstellung integrierter Schaltkreise verwendet wird. Auf der Oberseite des Substrats 810 sind die Bauelemente 820 mit an sich bekannten Methoden der Halbleitertechnologie prozessiert. Auf der Unterseite des Substrats 810 sind als Probenaufnahmen kanalartige Probenkammern 623 gebildet, die mit einer Deckschicht 830 verschlossen sind. Die Probenkammern 623 besitzen Ausmaße von beispielsweise ... μm (Querschnittsdimension) und ... mm (Länge). Die Probenkammern 623 können auch in einer strukturierten Substratschicht gebildet sein, die auf dem Substrat angeordnet ist (siehe Fig. 9). Die Deckschicht 830 besteht aus einem Kunststoffmaterial, Glas oder einem Halbleitermaterial.

[0050] Es können auch mehrere Ebenen mit Probenkammern 623 vorgesehen sein, wie dies in Fig. 9 illustriert ist. Auf dem Substrat 810 kann eine erste, strukturierte Substratschicht 811 mit Probenkammern 623 und einer ersten Deckschicht 830 vorgesehen sein. Auf der ersten Deckschicht 830 kann mindestens eine weitere strukturierte Substratschicht 812 mit Probenkammern 623 und einer weiteren Deckschicht 831 vorgesehen sein. Bei dieser Ausführungsform wird vorteilhafterweise ein vergrößertes Probenvolumen am zugehörigen Probendatenspeicher aufgenommen. Die Befüllung oder Probenaufnahme an den Kryospeicherelementen 620 gemäß den Fig. 8 und 9 erfolgt über Schlauchanschlüsse, die in die Verkapselung der Probendatenträger 622 integriert sind und nach der Verwendung abgeschnitten oder abgeklemt werden.

[0051] In den Fig. 10 und 11 sind verschiedene Geometrien der kanalartigen Probenaufnahmen 623 in den Substraten 810 schematisch illustriert. Es können beispielsweise mäanderförmige oder U-förmige Kanalformen mit verschiedenen Querschnittsdimensionen vorgesehen sein, die ggf. ineinander verschachtelt angeordnet sind.

[0052] Die in den Fig. 2 bis 11 dargestellten Ausführungsformen der Erfindung besitzen eine Reihe von Vorteilen. Das Kryospeicherelement wird durch einen elektronischen Chip gebildet, der als Probendatenspeicher einen elektronischen von außen beschreibbaren und lesbaren Speicher enthält. Eine temperaturabhängige Justage eines Lese-/Schreibkopfes etwa wie bei einem CD-Speicher ist nicht erforderlich. In dem Chip befindet sich mindestens eine Probenaufnahme entsprechend für einen oder mehrere Proben. Der Chip und/oder die Aufnahmefassung können mit einer elektronischen Schaltung zur Ansteuerung zusätzlicher Funktionselemente, Sensoren und/oder Alarmsystemen ausgestattet sein. Der in Fig. 1 gezeigte Aufbau kann als dreidimensionales Mehrebenen-Kryosubstrat hergestellt werden, bei dem mehrere Leiterplatten 610 mit einer Vielzahl von Kryospeicherelementen übereinander gestapelt werden.

[0053] Die chipförmigen Speicherelemente können problemlos im gefrorenen Zustand von der Leiterplatte entnommen und auf andere Leiterplatten, Messeinrichtungen oder Bearbeitungsstationen übertragen werden, ohne dass die Probendaten verloren gehen. Die Kryospeicherelemente sind von außen elektronisch adressierbar.

[0054] Zusätzlich können zur Mehrfachabsicherung die Kryospeicherelemente mit einer oder mehreren Kennungen, automatisch lesbaren oder visuell kontrollierbaren Farbmarkierungen versehen sein. Die Kryospeicherelemente lassen sich gegenüber den Dimensionen herkömmlicher, integrierter Schaltkreise auch weiter miniaturisieren. Bei Miniaturisierung wird eine optische Ansteuerung anstelle der elektrischen Kontaktierung bevorzugt.

[0055] Die mindestens eine Leiterplatte eines Speichersubstrates kann mit einem Computer-Bus-System verbunden sein, mit dem eine individuelle Abfrage und Ansteuerung der einzelnen Kryospeicherelemente erfolgt. Die in Fig. 15 dargestellte Form von Kryospeicherelementen kann anwendungsabhängig abgewandelt werden (z. B. runde oder mehreckige Probenträger).

[0056] Wichtige Merkmale der Erfindung werden im Folgenden zusammengefasst.

[0057] Erfindungsgemäße Speichersubstrate kombinieren eine Materialaufnahme mit einer probenspezifischen Datenaufnahme. Während der Tieftemperaturlagerung ist die selektive Entnahme von Material (Zellen, Zellsuspensionen) und das Lesen/Ablegen von Daten und/oder Datenmaterial möglich.

[0058] Die Datenidentifizierung wird mehrfach abgesichert, indem die Proben und die Probendatenspeicher an den gleichen oder unmittelbar aneinandergrenzenden Substratpositionen angeordnet sind. Zusätzlich kann das Speichersubstrat gefärbt sein, so dass allein aus der Färbung des Kryospeicherelements und des Grundkörpers festgestellt werden kann, aus welchem Speichersubstrat die jeweilige Probe stammt.

[0059] Die Kryospeicherelemente sind leicht desinfizierbar und wiederverwendbar.

[0060] Es ist ferner möglich, die Grundkörper und Kryospeicherelemente eines Speichersubstrates einheitlich mit einem Farbton oder einem digitalen oder analogen Erkennungsmuster zu versehen, die jederzeit eine eindeutige Zuordnung beider Teile zulässt. Dies besitzt Vorteile für eine automatisierbare, optische Kontrolle (z. B. Farb- und Codierungserfassung).

[0061] Auf dem erfindungsgemäßen Kryospeicher können erstmals Probendaten in Kilobyte- bis Megabytebereich gespeichert werden. Dies ist insbesondere bei der Speicherung von Messergebnissen von Vorteil.

[0062] Während der Nutzungsdauer eines Speichersubstrates können jederzeit Daten ergänzt werden (Datenakkumulation). Auf diese Weise lassen sich alle an den Proben erworbenen Daten bzw. alle ausgeführten Manipulationen, Messungen, Behandlungen oder dergleichen lückenlos probenspezifisch dokumentieren.

[0063] Es können spezifische Behandlungen der Proben insbesondere in den Chip-förmigen Speicherelementen selektiv mit einer Prozedurprogrammierung und -speicherung durchgeführt werden. Beispielsweise kann im Rahmen einer Kryokonservierung ein bestimmtes Heiz-, Kühl-, Mess-, Kontroll- und Alarm-/Anzeigeprogramm abgearbeitet und im Programm datenspeicher dokumentiert werden. Im gefrorenen Zustand können verschiedene Kryospeicherelemente verschiedene Temperatur- oder Messprogramme durchlaufen. Es kann z. B. lokal ein Auftauen ausgelöst werden, um eine Messung an der Probe durchzuführen.

[0064] Es kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass das Speichersubstrat mit einer rein elektronischen Datenbank kombiniert betrieben wird, in der die Probendaten des Speichersubstrates gespiegelt abgelegt sind.

[0065] Die Abdeckung der Probenaufnahmen kann teilweise oder vollständig transparent sein. Durch diese Schicht werden optische und andere Messverfahren in die Probenaufnahme eingekoppelt. Beispielsweise können die Proben bildhaft dargestellt werden. Es sind Fluoreszenzmessungen, dielektrische Messungen und/oder Ultraschalldarstellungen möglich.

[0066] Eine erfindungsgemäße Kryodatenbank umfasst eine Vielzahl der erläuterten Speichersubstrate, eine Steuereinrichtung und eine Bearbeitungseinrichtung zur Manipulierung der Speichersubstrate und zur Entnahme von Pro-

ben.

[0067] Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen und den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein. 5

Patentansprüche

1. Verfahren zur Kryokonservierung, bei dem auf einem Speichersubstrat mindestens eine Probe angeordnet und positionsspezifisch Probendaten, die für Merkmale der Probe charakteristisch sind, gespeichert werden. 10
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Probendaten auf dem Speichersubstrat an, neben oder unter der Probe gespeichert werden. 15
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem als Probendaten Informationen zur Identifizierung der Probe, Informationen über Substanzmerkmale der Probe, Messergebnisse und/oder Behandlungsschritte gespeichert werden. 20
4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Probendaten im gekühlten Zustand des Speichersubstrates gelesen und/oder beschrieben werden. 25
5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Probe vom Substratspeicher in Verbindung mit den gespeicherten Probendaten entnommen und auf ein anderes Substrat oder zu einer Meß- oder Behandlungseinrichtung überführt wird. 30
6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Probendaten optisch, magnetisch, topographisch oder elektromagnetisch gespeichert werden. 35
7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Probe eine Suspension von mindestens einer Zelle, Zellbestandteilen, Zellaggregaten und/oder Gewebe umfasst. 40
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, bei dem die Probe zusätzlich Referenz- und Sondenproben umfasst. 40
9. Verfahren gemäß einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem an einer gefrorenen, erwärmten oder aufgetauten Probe im gekühlten Zustand des übrigen Speichersubstrats eine Messung und/oder eine Behandlung erfolgt und die Messergebnisse als Probendaten gespeichert werden. 45
10. Verfahren gemäß einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem eine Steuerung des Zustandes der Probe auf dem Speichersubstrat mit einem der Probe zugeordneten Rechnerschaltkreis erfolgt. 50
11. Verfahren gemäß einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem die Probe in mindestens einem Kryospeicherelement angeordnet wird, das mindestens eine schlauch-, kapillar- oder kanalförmige Probenkammer (615, 623) enthält. 55
12. Speichersubstrat zur Kryokonservierung mindestens einer Probe, das mindestens ein Kryospeicherelement enthält, das durch einen Probenträger und einen Probendatenspeicher gebildet wird. 60
13. Speichersubstrat gemäß Anspruch 12, bei dem das mindestens eine Kryospeicherelement ein integrierter Schaltkreis mit einem Speicher ist, wobei der Schaltkreis lösbar auf dem Speichersubstrat angeordnet und mit mindestens einem Probenträger zur Aufnahme jeweils mindestens einer Probe ausgestattet ist. 65
14. Speichersubstrat gemäß Anspruch 13, bei dem der Probenträger in den Aufbau des Schaltkreises integriert

ist.

15. Speichersubstrat gemäß Anspruch 14, bei dem der Probenträger mindestens eine schlauch-, kapillar- oder kanalförmige Probenkammer (615, 623) aufweist.

16. Speichersubstrat gemäß Anspruch 15, bei dem der Probenträger durch einen Rahmen (627) gebildet wird, an dem die mindestens eine Probenkammer als schlauch-, kapillar- oder kanalförmiger Kryobehälter (615) angeordnet ist.

17. Speichersubstrat gemäß Anspruch 15, bei dem der Probenträger als kanalförmige Probenaufnahme (623) in einem Substrat (810) des integrierten Schaltkreises (800) vorgesehen ist.

18. Speichersubstrat gemäß einem der Ansprüche 12 bis 17, bei dem das Kryospeicherelement einen Rechterschaltkreis enthält, mit dem die Funktion des Kryospeicherelements verwaltet wird und über den das Kryospeicherelement nach außen kommuniziert.

19. Kryospeicherelement, das eine Probenaufnahme für eine Probe und einen Datenspeicher zur Speicherung von Probendaten umfasst.

20. Kryospeicherelement gemäß Anspruch 19, bei dem die Probenaufnahme mindestens eine schlauch-, kapillar- oder kanalförmige Probenkammer (615, 623) aufweist.

21. Verfahren zum Betrieb einer Kryobank, bei dem die Proben mit einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 kryokonserviert und/oder behandelt werden.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

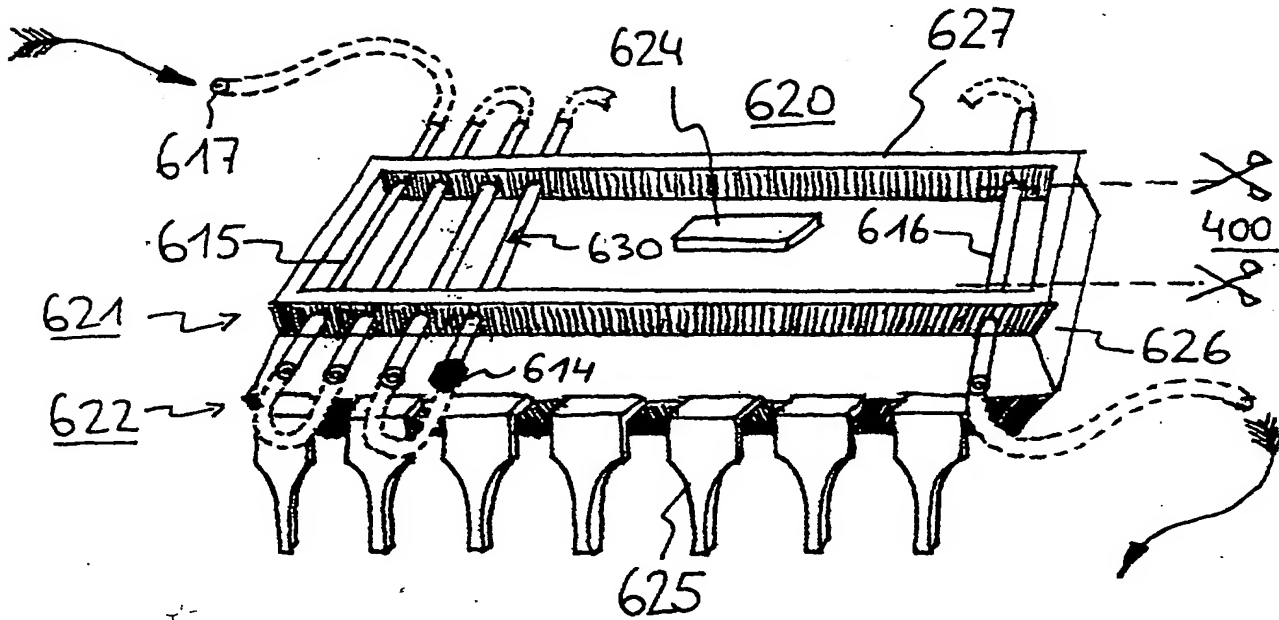


Fig. 2

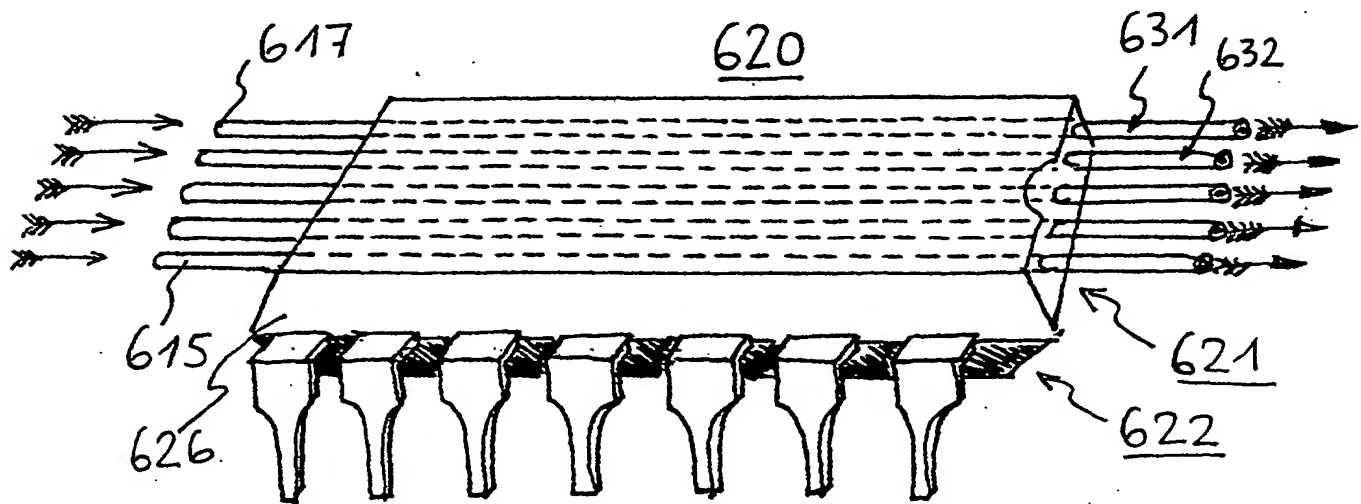
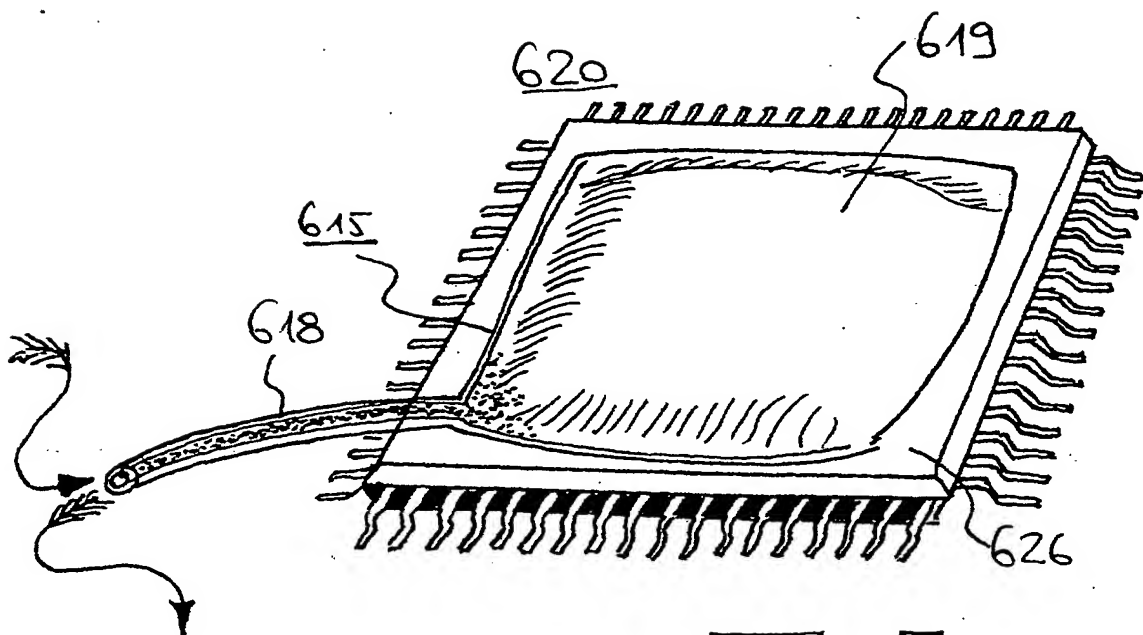
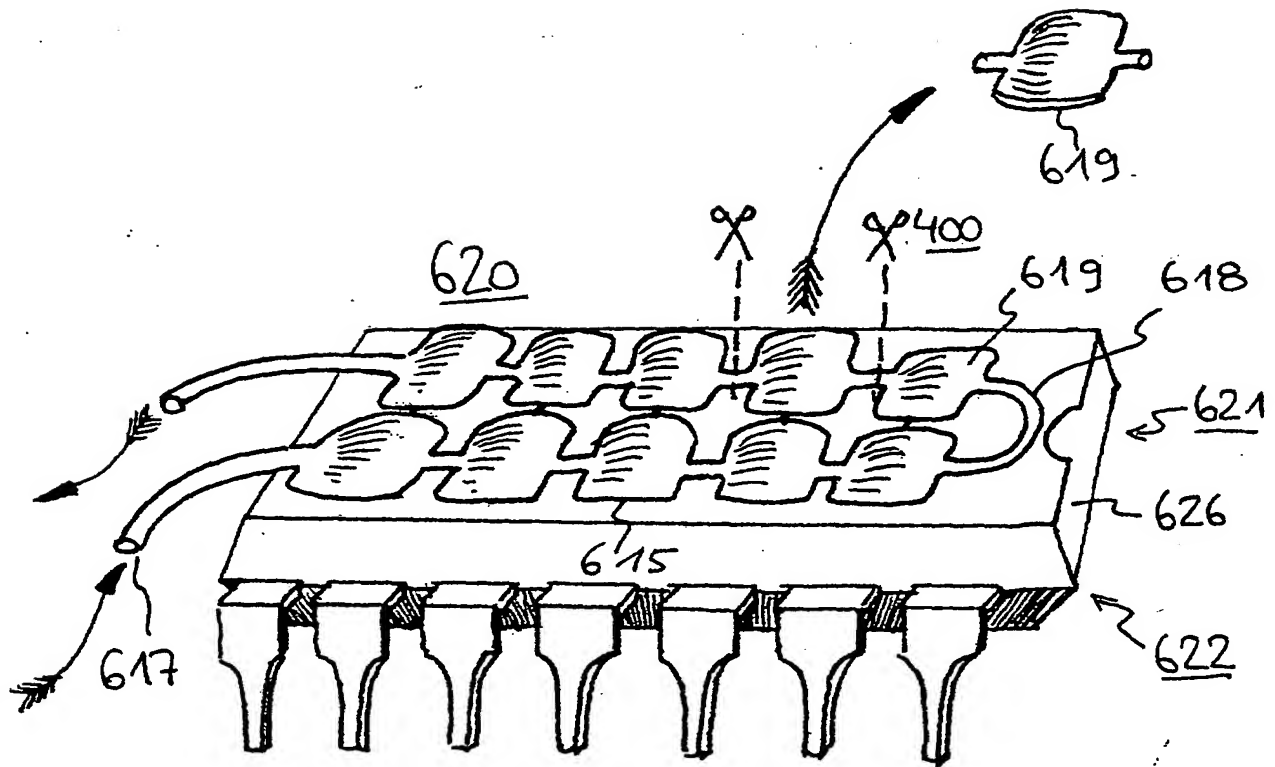
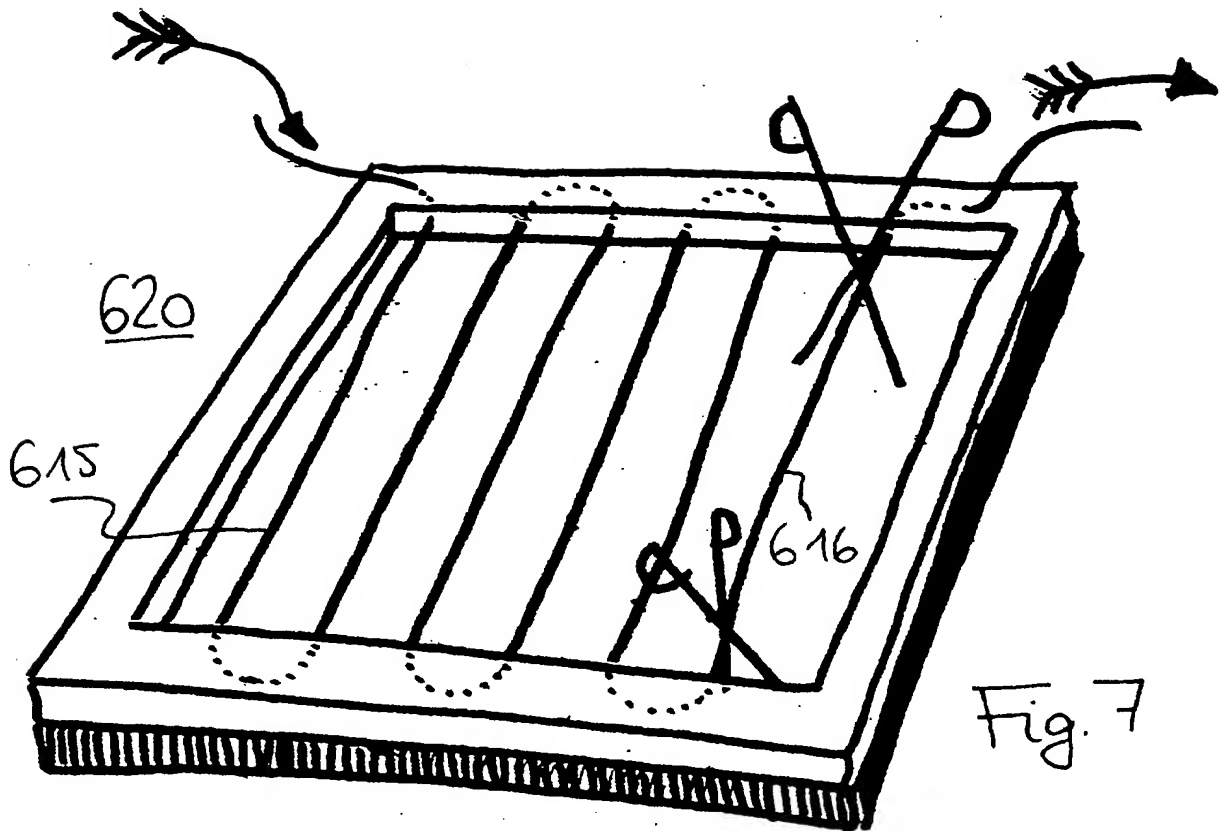
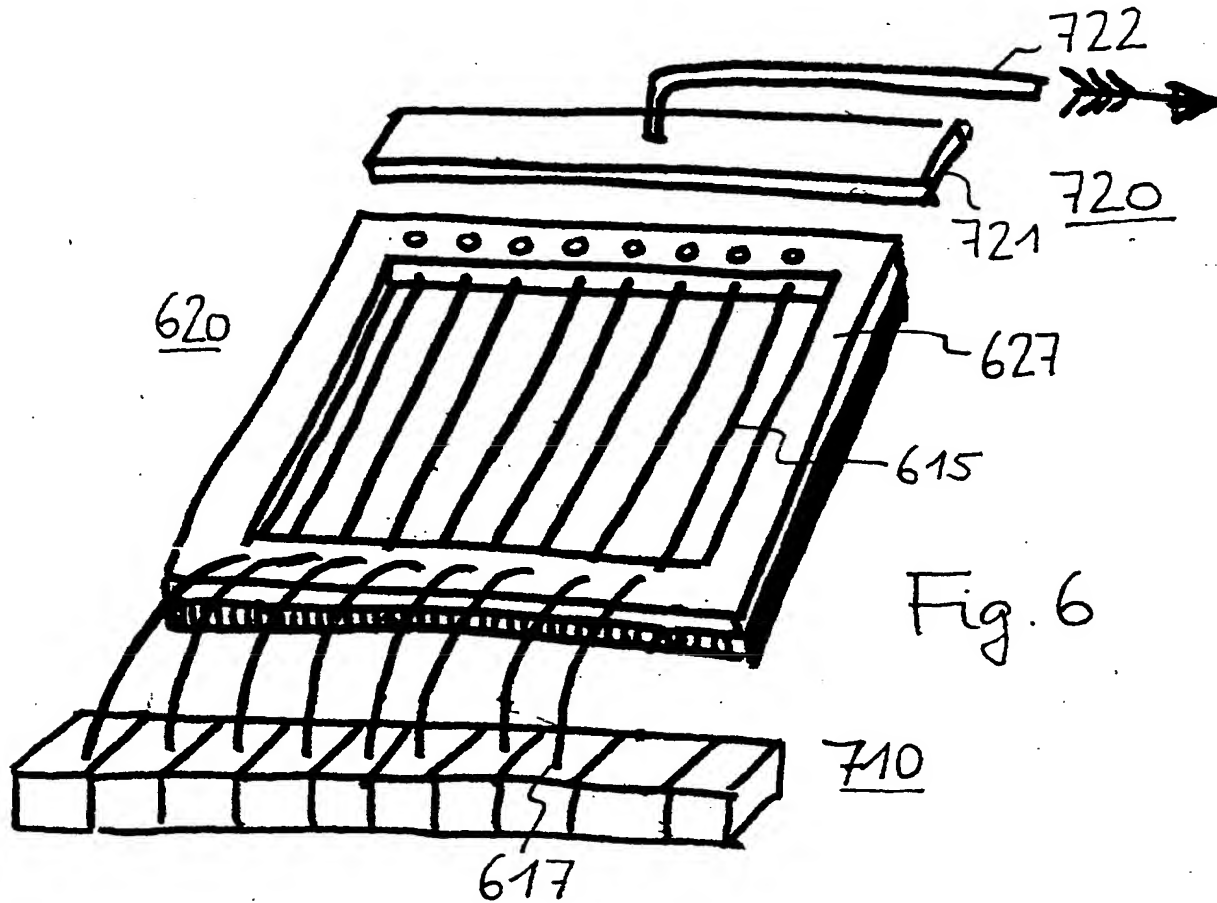
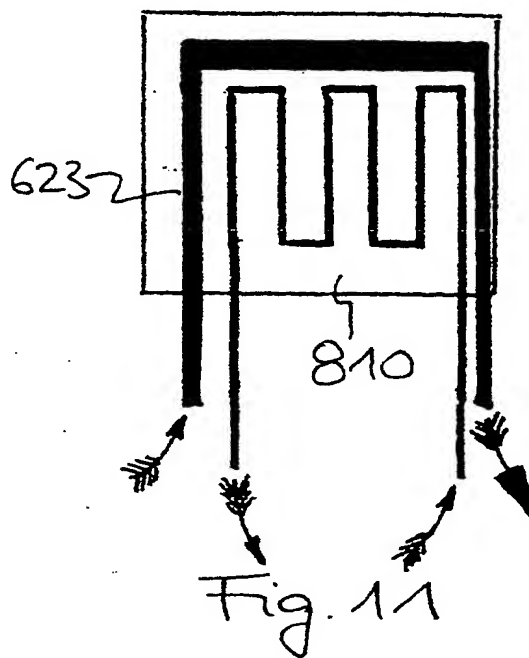
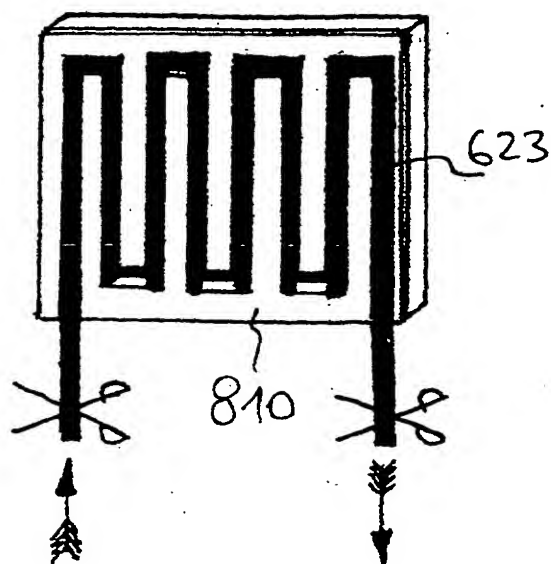
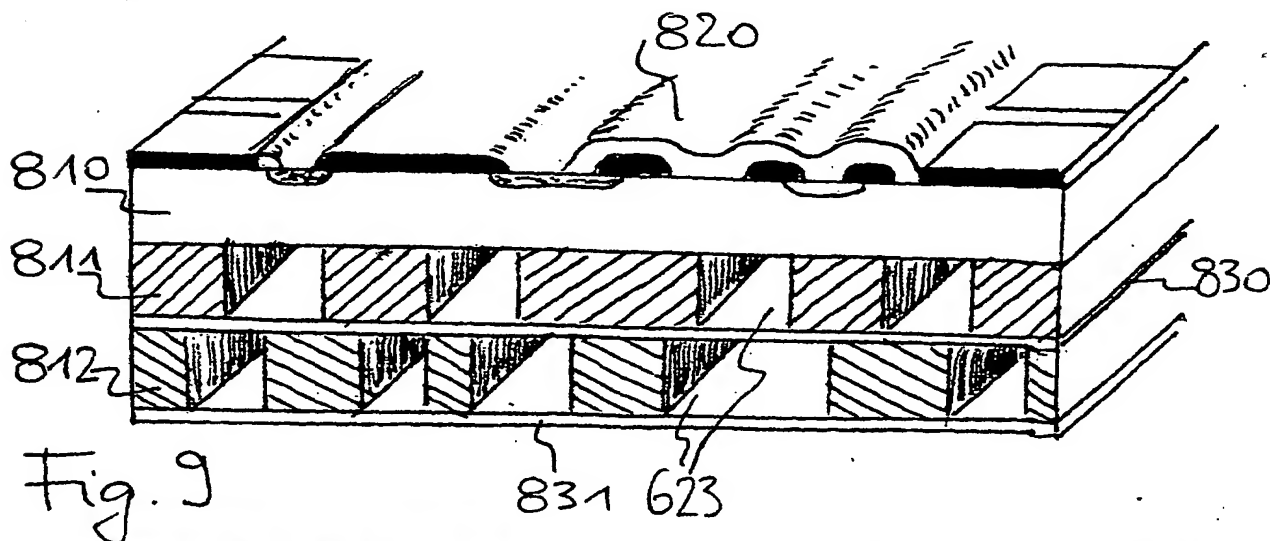
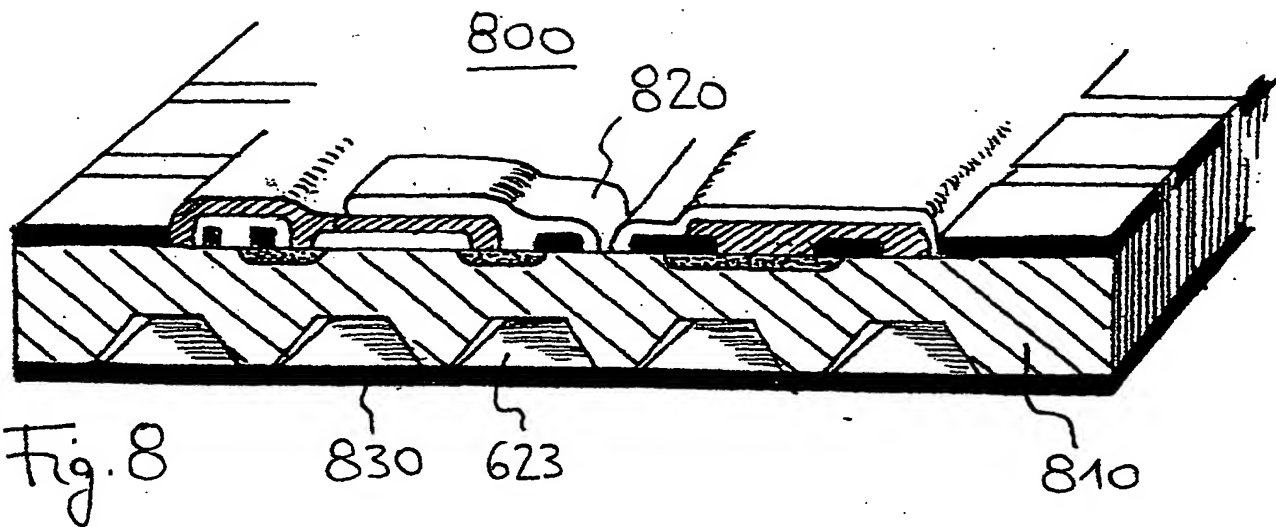


Fig. 3







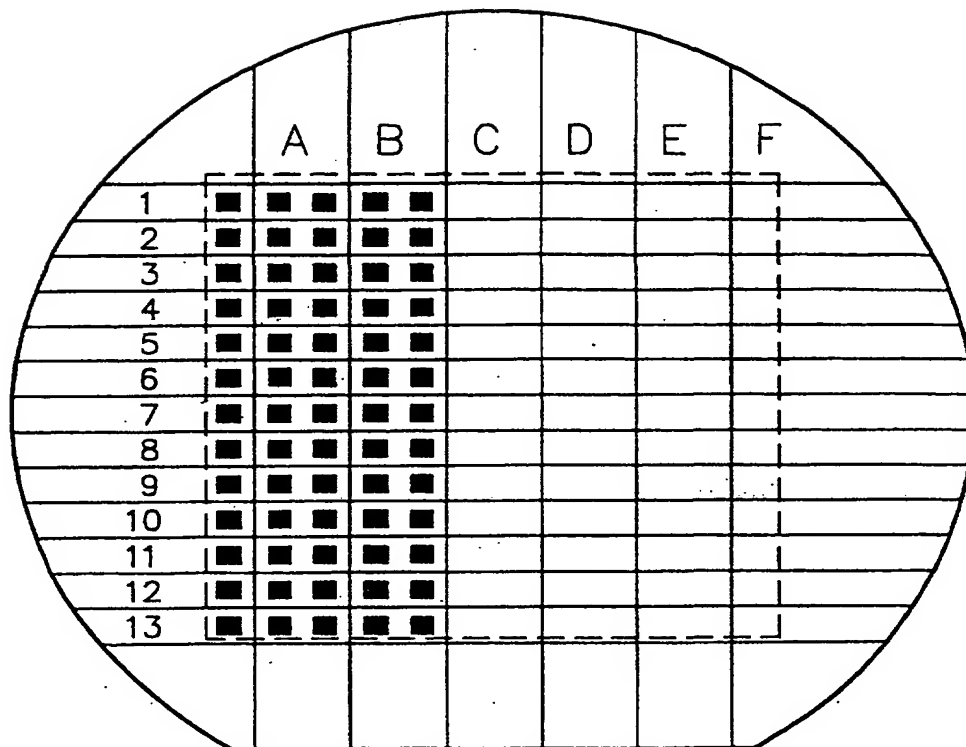


FIG.12
Stand der Technik

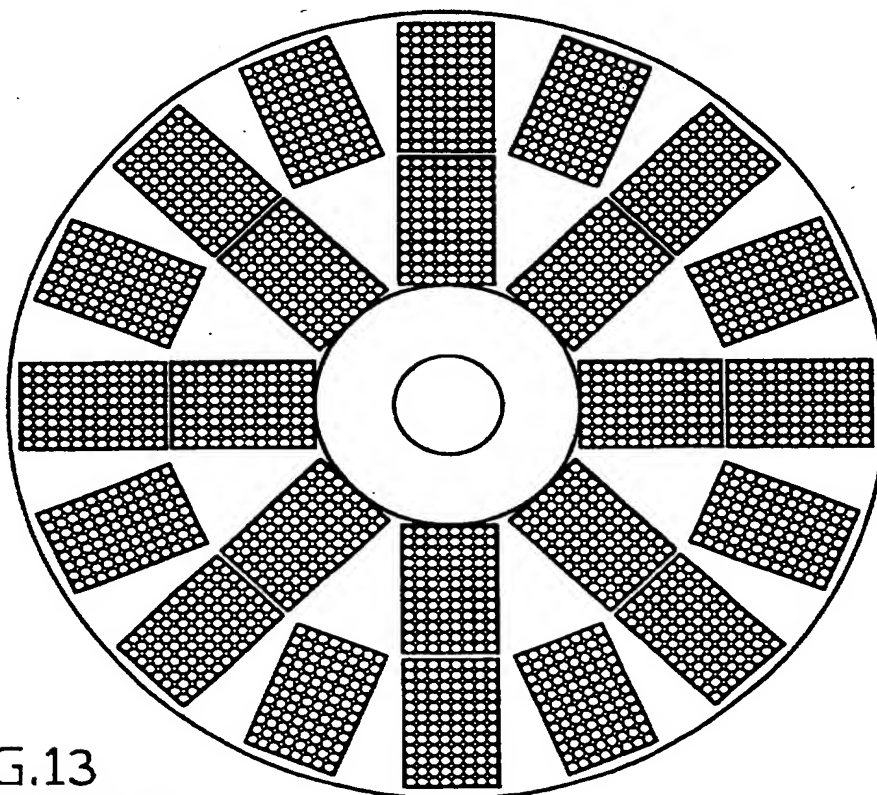


FIG.13
Stand der Technik

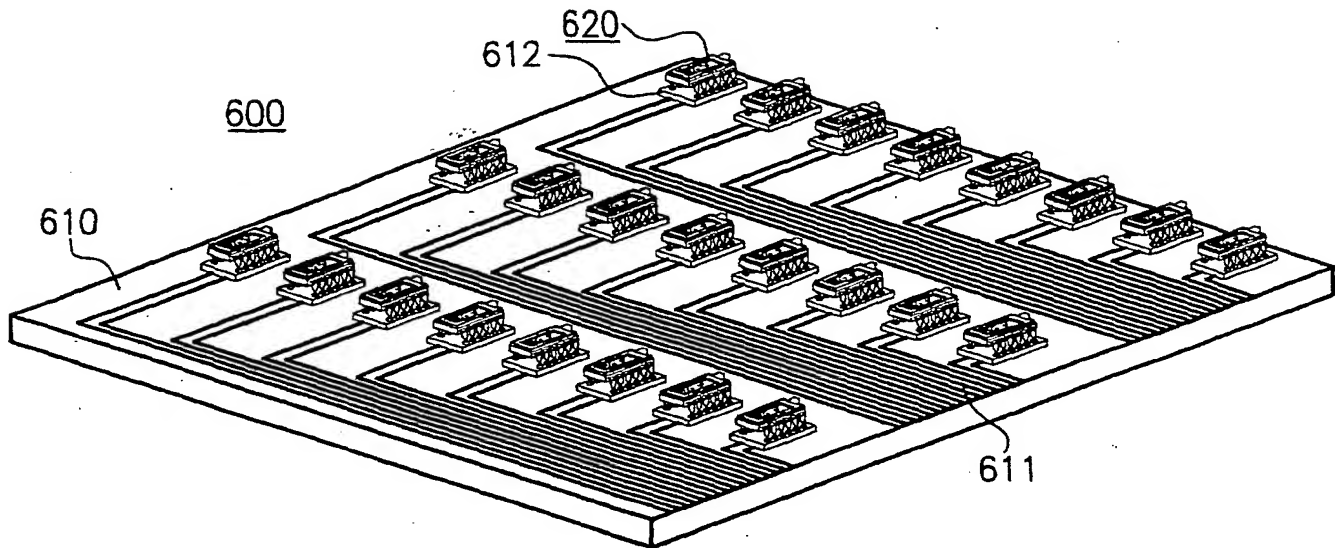


FIG.1

